

relative error of proposed technique presents 2,27%. The content of phenol compounds in the leaves of *Alnus glutinosa* averages out 18,72%. The conditions providing for maximum extraction of biologically active compounds from samples studied are described: extractant is 60% ethyl alcohol, crude drug particles of 2 mm, time of heating in boiling water bath is 40 min., correlation "crude drug – extractant" is 1:60. Optimal factors of chemical reaction between the phenols of *Alnus glutinosa* leaves and the reagent Folin-Ciocalteu are presented (quantity of reagent is selected, concentration of sodium carbonate is established, time of reaction products stability is determined).

Поступила 03.09.2007

О.А. Ёршик, Г.Н. Бузук

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ В САБЕЛЬНИКЕ БОЛОТНОМ *COMARUM PALUSTRE* L.

Витебский государственный
медицинский университет

Предложена методика количественного определения проантоцианидинов в различных органах сабельника болотного спектрофотометрическим методом, основанная на кислотном гидролизе указанных соединений до антоцианидинов в присутствии катализатора (ионов Fe^{3+}). Подобраны оптимальные условия извлечения суммы проантоцианидинов из растительного сырья сабельника болотного (тип экстрагента – 70% этанол, измельченность сырья – 0,25 мм, время экстрагирования – 20 мин, соотношение сырья и экстрагента – 1:40).

Расчет содержания проантоцианидинов проводился с использованием удельного показателя поглощения 352, определенного для очищенной суммы проантоцианидинов, выделенных из сырья сабельника болотного. Относительная погрешность предложенной мето-

дики составляет 4,38 %. Методика отличается хорошей воспроизводимостью результатов, для ее выполнения не требуется наличия стандартных образцов. Наибольшее содержание проантоцианидинов обнаружено в стеблях и корневищах, что позволяет рекомендовать указанные органы в качестве лекарственного растительного сырья сабельника болотного.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из современных проблем медицины является лечение заболеваний опорно-двигательного аппарата. Данные заболевания протекают, как правило, в хронической форме, поэтому прием назначаемых лекарственных средств является длительным, иногда пожизненным. Современные противовоспалительные средства широко применяются при этих заболеваниях, оказывая влияние не только на опорно-двигательную систему, но и на желудочно-кишечный тракт в виде многочисленных побочных эффектов. Более того, действие синтетических противовоспалительных препаратов направлено, главным образом, лишь на симптоматическое лечение, а не на устранение причин возникшей воспалительной реакции.

В отличие от синтетических, лекарственные средства из лекарственного растительного сырья обладают малой токсичностью, значительно лучшей переносимостью, возможностью длительного приема. Арсенал применяемых противовоспалительных средств из лекарственных растений весьма ограничен, поэтому актуальным является поиск новых видов лекарственных растений, их стандартизация и разработка новых готовых лекарственных средств на их основе. Одним из таких перспективных растений является сабельник болотный.

Сабельник болотный представляет собой небольшой многолетний полукустарник с длинным деревенеющим подземным стеблем. Надземная часть стебля – приподнимающиеся ветви. В нижней части ветви голые с блестящей поверхностью буровато-пурпурного или ржаво-бурого

цвета, в верхней – зеленые, густо опушенные. Стебель постепенно переходит в длинное (до 1 м) горизонтальное корневище, которое имеет гладкую блестящую поверхность бурого цвета; наиболее старые его участки – черно-бурого цвета. В узлах корневище выпускает тонкие нитевидные корни длиной 5 – 10 см [1-3].

Листья сложные непарноперистые; нижние состоят из 5 – 7 листочков, на длинном черешке, у основания расширенном в виде стеблеобъемлющего влагалища; верхние – из 3 – 5 листочков, с прилистниками, к основанию сросшимися с черешком. Отдельные листочки сложного листа продолговато-ланцетные, острозубчатые, сверху темно-зеленого цвета, снизу беловато-зеленые или почти белые от обилия волосков. Жилки выдаются с нижней стороны листа, часто темно-пурпурного цвета. Соцветие рыхлое из немногочисленных цветков, олиственный. цветоножка выходит из пазух листьев, густо опушена. Цветки имеют двойную чашечку, разрастающуюся при созревании плодов. Чашелистиков 10; из них 5 наружных (подчашие) – маленькие, узкие; внутренние чашелистики значительно крупнее и шире наружных, слегка завернутые внутрь с темно-пурпурной бархатистой поверхностью. Лепестки (5) мелкие, значительно мельче чашелистиков, темно-пурпурные. Тычинки и пестики многочисленные, сидят на коническом цветоложе. Плод сборный; плодики — многочисленные семанки [1-3]. Высушенное растение имеет слабый очень приятный запах, напоминающий аромат чая. Цветет в июне-июле, плоды созревают в августе [1-3].

Сабельник болотный широко применяется в народной медицине. Его корневище в форме настоя и отвара применяется как ранозаживляющее и болеутоляющее при гастралгии, настойка из корневищ – при бронхитах, туберкулёзе и особенно часто – при различных заболеваниях суставов. В настоящее время выпускают биологически активную добавку (БАД) «Сабельник-Эвалар» (настойка, таблетки), которая рекомендована Минздравом Российской Федерации в качестве общеукрепляющего средства при повышенных на-

грузках на опорно-двигательный аппарат. В комплексном лечении ревматоидных артритов, обменно-дистрофических остеоартрозов, артрита, спондилоартроза и остеохондроза позвоночника БАДы на основе сабельника болотного хорошо зарекомендовали себя, показали положительные результаты при практически полном отсутствии токсичности и побочных эффектов [4].

В современной отечественной медицине не существует аналогов лекарственных средств сабельника болотного, поэтому актуальным является стандартизация сырья сабельника болотного и разработка лекарственных средств на его основе.

Химический состав сабельника болотного представлен полифенольным комплексом, в котором преобладают дубильные вещества, главным образом, конденсированные [1-3]. В настоящее время конденсированные дубильные вещества рассматриваются как высокополимерные производные проантоцианидинов [5] (рис. 1). Конденсированные дубильные вещества – линейные полимерные производные катехинов, лейкоантоцианидинов и других восстановленных форм флавоноидов [5]. Как правило, представляют собой линейные полимеры, отдельные мономеры (катехины и лейкоантоцианидины, соединенные С2-С6 связью) которых способны к ограниченному вращению вокруг соединяющей их связи, в результате чего молекула может приобретать стабильную спиральную конформацию с фенольными гидроксильными группами, расположенными по периферии такой спирали. Помимо высокополимерных, в растениях также содержатся олигомерные производные проантоцианидинов со степенью полимеризации 1-10.

Согласно имеющимся литературным данным, проантоцианидины обладают широким спектром фармакологической активности: антиоксидантной [6], цитопротекторной [7], гастро- и кардиопротекторной [8], противоопухолевой, противосклеротической [9], а также значительной противовоспалительной [10, 11], в том числе влияющей на метаболизм хондроцитов и экспрессию COX-1 и COX-2 [11].

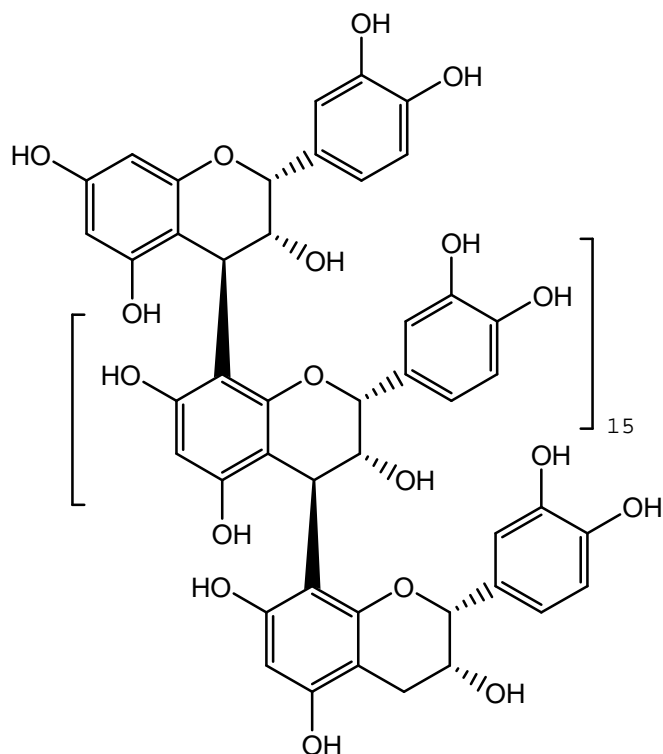


Рис. 1. Пример проантоцианидина, выделенного из растения *Sorghum*
(эпикатехин-[(4β->8)-эпикатехин]₁₅-(4β->8)-катехин)

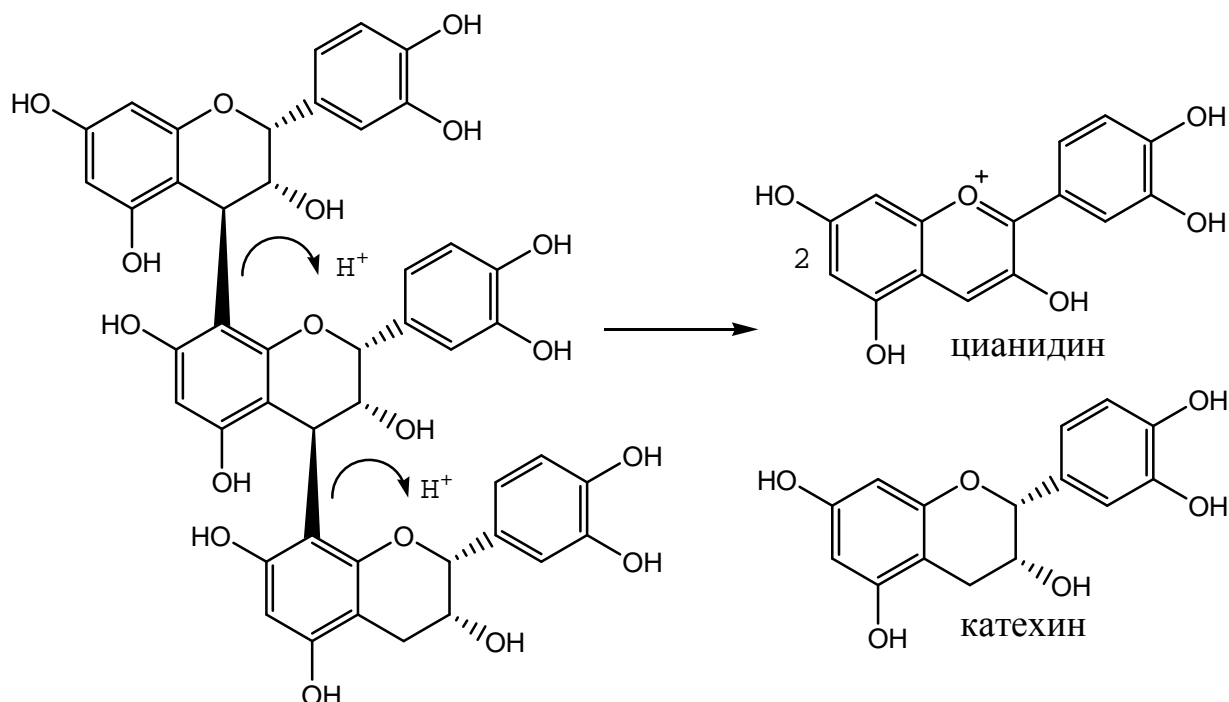
Согласно имеющимся литературным данным, проантоцианидины обладают широким спектром фармакологической активности: антиоксидантной [6], цитопротекторной [7], гастро- и кардиопротекторной [8], противоопухолевой, противосклеротической [9], а также значительной противовоспалительной [10, 11], в том числе влияющей на метаболизм хондроцитов и экспрессию COX-1 и COX-2 [11]. Последняя активность в значительной степени объясняет положительный эффект сабельника болотного на опорно-двигательный аппарат содержащимися в этом растении проантоцианидинами. Данное обстоятельство послужило основанием для выбора проантоцианидинов в качестве основной группы действующих веществ для стандартизации сырья и лекарственных средств из сабельника болотного.

Целью данной работы является разработка методики количественного определения проантоцианидинов и изучение локализации указанных соединений в растении сабельник болотный.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали три серии образцов растений сабельника болотного, заготовленных в июле 2006 г. в местах естественного произрастания в окрестностях г. Витебска Республики Беларусь. Собранные растения высушивали целиком, затем разделяли на органы. До проведения анализов образцы хранились в бумажных пакетах при комнатной температуре.

Для количественного определения конденсированных дубильных веществ использовали модифицированный метод Porter [12], в основе которого лежит кислотный гидролиз олигомерных и полимерных проантоцианидинов до антоцианидинов в присутствии катализатора (ионов Fe^{3+}). Метод является высокочувствительным, однако изменение в соотношении реактивов в рецептуре и температурных условий в значительной степени снижают выход продукта цветной реакции и чувствительность определения [13].

Рис. 2. Схема гидролиза проантоцианидина (эпикатехин₂ 4β->8 катехин)

При подборе оптимальных условий извлечения суммы проантоцианидинов из различных органов сабельника болотного было изучено влияние следующих факторов: тип экстрагента, измельченность сырья, время экстрагирования, соотношение сырья и экстрагента.

При установлении оптимального экстрагента были исследованы вода и водные растворы этанола различных концентраций (10 - 96%). Полученные данные по

влиянию концентрации этанола на экстракцию суммы проантоцианидинов из корневищ сабельника болотного представлены на рис. 3. Как видно из представленных на рис. 3 данных, лучшим экстрагентом для извлечения суммы проантоцианидинов является водный раствор этанола в диапазоне концентраций 50 - 80% с максимумом при 70%. Данная концентрация этанола использовалась в дальнейших исследованиях.

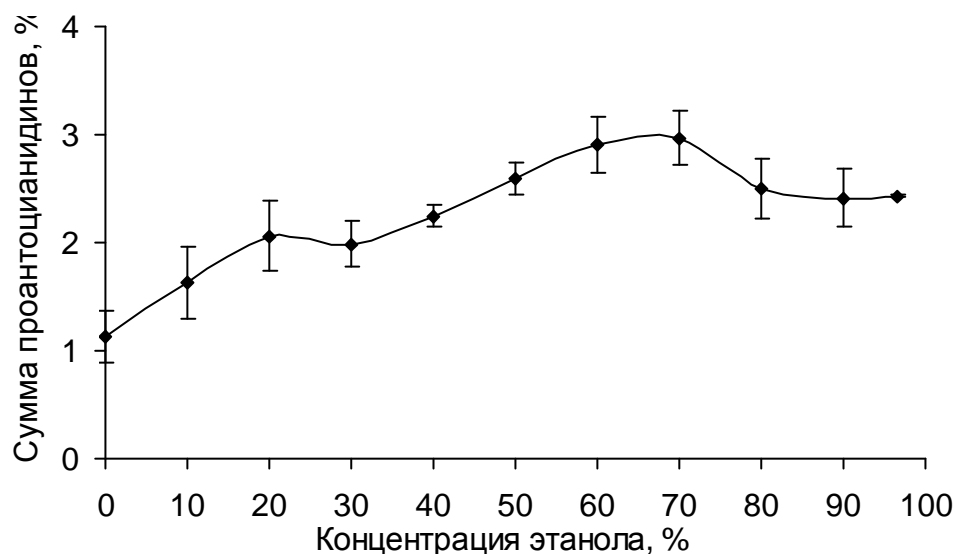


Рис. 3. Влияние концентрации этанола на извлечение суммы проантоцианидинов из корневищ сабельника болотного

Для установления оптимального времени экстракции извлечение из сырья проводили в течение 5 – 120 мин. Полу-

ченные при этом данные представлены на рис. 4.

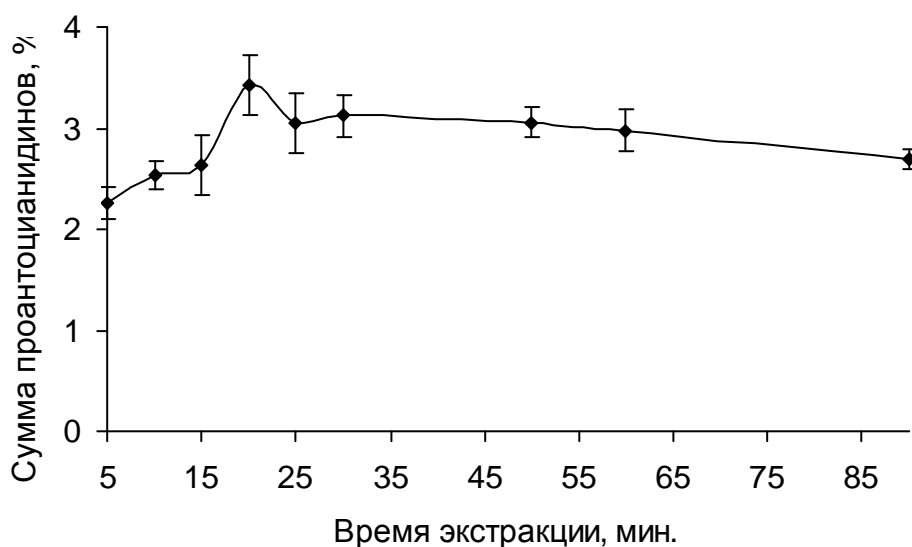


Рис. 4. Влияние времени экстракции на извлечение суммы проантоцианидинов из корневищ сабельника болотного

Как видно из данных на рис. 4, наибольший выход проантоцианидинов наблюдается при экстракции в течение 20 мин. Дальнейшее увеличение времени экстракции отрицательно влияет на этот процесс, что может быть обусловлено конденсацией олигомерных и высокополимерных

растворимых в водном этаноле проантоцианидинов в нерастворимые.

На извлечение проантоцианидинов из сырья сабельника болотного оказывает влияние соотношение сырья и экстрагента (рис.5). Оптимальное извлечение суммы проантоцианидинов наблюдается при соотношении сырья и экстрагента 1:40.

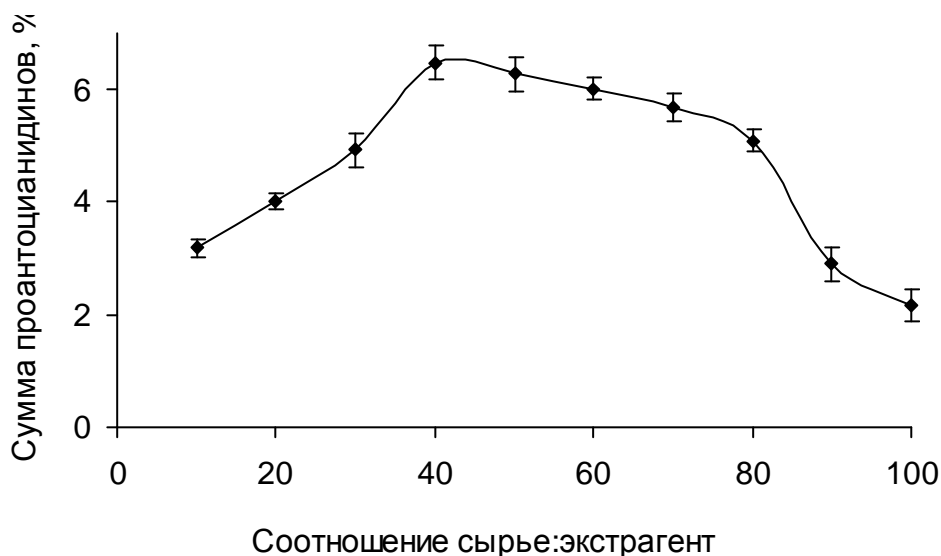


Рис. 5. Влияние соотношения сырье:экстрагент на извлечение суммы проантоцианидинов из корневищ сабельника болотного

Кроме перечисленных выше параметров, на степень извлечения проанто-

цианидинов также оказывает степень измельченности сырья. Максимальная экс-

тракция проантоцианидинов наблюдается при наименьшей из исследованной (0,25 – 2 мм) измельченности сырья сабельника болотного. Исследовать степень извлечения проантоцианидинов из сырья измельченностью менее 0,25 мм не представляется возможным, так как при экстракции образуется устойчивая суспензия, что препятствует измерению оптической плотности на спектрофотометре.

МЕТОДИКА

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц (250). Около 0,500 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл 70% спирта этилового, закрывают пробкой, взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г, присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры колбу с пробкой взвешивают и доводят до первоначальной массы 70 % спиртом этиловым. Содержимое колбы центрифугируют в течение 10 – 15 мин со скоростью 2-3 тыс. об/мин.

0,1 мл полученного извлечения переносят в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 0,9 мл 70% спирта этилового, 0,2 мл железосодержащего реактива (2% раствор $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ в 1 н растворе кислоты хлороводородистой) и 6 мл 5% раствора кислоты хлороводородистой концентрированной в *n*-бутаноле (смешивают 950 мл спирта *n*-бутилового с 50 мл кислоты хлороводородистой концентрированной (24,8 %)), присоединяют колбу к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Раствор охлаждают при комнатной температуре.

После охлаждения измеряют оптическую плотность при длине волны 550 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения такой же раствор без спиртового извлечения без нагревания.

Содержание суммы проантоцианидинов в процентах (X) в абсолютно сухом сырье вычисляют по формуле 1:

$$X = \frac{A \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{V_3 \cdot m \cdot (100 - W) \cdot E_{1\text{см}}^{1\%}}, \quad (1)$$

где:

A – оптическая плотность исследуемого раствора;

$E_{1\%1\text{см}}$ – удельный показатель поглощения суммы проантоцианидинов, равный 352;

V_1 – объем экстракта, мл (20 мл);

V_2 – объем раствора для спектрофотометрирования, мл (7.2 мл);

V_3 – объем экстракта, взятый для определения, мл (0.1 мл);

m – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

1. Приготовление бутанола кислого: 950 мл спирта *n*-бутилового смешивали с 50 мл кислоты хлороводородистой концентрированной и перемешивали. Срок годности раствора 1 месяц.

2. Приготовление железосодержащего реактива: 0,5 г квасцов железосодержащих растворяли в 25 мл 2М раствора кислоты хлороводородистой, выдерживали в течение 12-16 часов, затем фильтровали через бумажный фильтр. Срок годности раствора 1 месяц [5].

Показатель удельного поглощения продукта реакции проантоцианидинов с реактивом Портера был определен для суммы проантоцианидинов корневищ с корнями сабельника болотного, выделенных и очищенных с помощью колоночной хроматографии [5].

Результаты количественного определения суммы проантоцианидинов представлены в таблице 1. Таким образом, результаты проведенных исследований создают предпосылки для решения проблемы химической стандартизации корневищ с корнями сабельника болотного. С учетом экспериментально установленных оптимальных условий экстракции и модифицированного метода Porter была исследована локализация суммы проантоцианидинов в различных органах сабельника болотного.

Таблица 1 - Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы проантоцианидинов в корневищах с корнями сабельника болотного

$\bar{X}, \%$	n	S	S^2	t(p,f)	Δx	$\varepsilon, \%$	$\varepsilon_{n=3}, \%$
4,11	10	0,75	0,56	2,26	0,47	4,38	2,53

Результаты количественного определения суммы проантоцианидинов в пе-

ресчете на цианидина хлорид представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Содержание суммы проантоцианидинов в различных органах сабельника болотного

Сырьё	Содержание суммы проантоцианидинов, %		
	Серия 1	Серия 2	Серия 3
стебель	4,55±0,19	4,19±0,18	4,69±0,21
корневище с корнями	4,60±0,20	4,58±0,20	4,70±0,18
лист	0,76±0,03	1,89±0,08	1,71±0,07
цветок	0,70±0,27	0,72±0,03	0,73±0,03

Исходя из данных таблицы 2, наибольшее содержание проантоцианидинов локализуется преимущественно в стебле и корневище с корнями сабельника болотного.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны оптимальные условия извлечения суммы проантоцианидинов из растительного сырья корневищ с корнями сабельника болотного (тип экстрагента – 70% этанол, измельченность сырья – 0,25 мм, время экстрагирования – 20 мин, соотношение сырья и экстрагента – 1:40).

2. Предложена методика количественного определения проантоцианидинов в различных органах сабельника болотного, основанная на использовании модифицированного метода Porter.

3. Впервые определен удельный показатель поглощения для очищенной суммы проантоцианидинов, выделенных из сырья сабельника болотного.

4. Наибольшее содержание проантоцианидинов сабельника болотного локализуется в стеблях и корневищах с корнями, что позволяет рекомендовать указанные органы в качестве лекарственного растительного сырья сабельника болотного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лантраторова, А.С. Сезонное развитие сабельника болотного и багульника

болотного в южной Карелии и динамика содержания минеральных и органических веществ в их растительном сырье / А.С. Лантраторова [и др.] // Сезонная ритмика и продуктивность дикорастущих лекарственных растений. – М., 1988. – С. 62-73.

2. Люкшенкова, Е.Я. Фармакологическое изучение сабельника болотного (*Comarum palustre* L.) / Е.Я. Люкшенкова, М. Георгиу, Э.А. Бурдыкина-Шехтер // Аптечное дело. – 1962. – № 2. – С. 34-44.

3. Наумчик, Г.Н. Фитохимическое исследование сабельника болотного и приготовление из него некоторых лекарственных препаратов: автореф. дис. ... канд. фарм. наук / Ленинградский хим. фарм. институт. – Л., 1964. – 17 с.

4. Чемесова, И.И. Определение содержания дубильных веществ в корневищах *Comarum palustre* L. и настойке из него спектрофотометрическим методом / И.И. Чемесова // Растительные ресурсы. – 2004. – Вып. 3. – С. 122-129.

5. Miami University's centralized web server for personal web pages [Electronic resource] / Professor Ann E. Hagerman. – Tannin Chemistry. – Oxford, 2002. – mode of access: <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>. – Date of access: 1.10.2006.

6. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention / D. Bagchi [et

al.] // Toxicology. –2000. – Vol. 148, N 2-3. – P. 187-197.

7. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds / D. Bagchi [et al.] // Ann N Y Acad Sci. – 2002. – Vol. 957. – P.260-270.

8. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells / X. Ye Mol. Cell. Biochem. – 1999. – Vol. 196, N 1-2. – P. 99-108.

9. Sovak, M. Grape Extract, Resveratrol, and Its Analogs: A Review / M. Sovak // J. Med. Food. – 2001. – Vol. 4, N 2. – P. 93-105.

10. Inhibitory effects of proanthocyanidins from Ribes nigrum leaves on carrageenin acute inflammatory reactions induced in rats / N. Garbacki [et al.] // BMC Pharmacol. – 2004. – Vol. 4. – P.25-32.

11. Effects of prodelphinidins isolated from Ribes nigrum on chondrocyte metabolism and COX activity / N. Garbacki [et al.] // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. – 2002. – Vol. 365, N 6. – P. 434-441.

12. Porter, L.J. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin / L.J. Porter, L.N. Hrstich, B.C. Chaw // Phytochemistry. – 1986. – Vol. 25. – P. 223-230.

13. Хишова, О.М. Количественное определение процианидинов плодов боярышника / О.М. Хишова, Г.Н. Бузук // Хим. фармац. журнал. – 2006. – Т. 40, № 2. – С. 20-21.

SUMMARY

O.A. Yorshyk, G.N. Buzuk

QUANTITATIVE DEFINITIONS OF PROANTHOCYANIDINS IN COMARUM PALUSTRE L.

Methodics of quantitative definition of proanthocyanidins in different organs of Comarum palustre are suggested by spectrophotometric ways based on acid hydrolysis of indicated combinations into anthocyanidins (ions Fe^{3+} acting as catalyst).

Optimal conditions have been created for the extraction of a sum of proanthocyanidins out of vegetable raw substance material of Comarum palustre (extragent type – ethanol 70 %, finesse of the raw substance 0,25 mm, extraction time 20 mins, raw substance – extragent ratio 1:40).

The calculation of proanthocyanidins content was conducted with the use of a specific indicator of absorption 352 which was estimated for purified mixture of proanthocyanidins out of vegetable raw substance material of Comarum palustre. The relative inaccuracy of the suggested methodics are notable for good results reproduction and its execution does not require Standard samples. The greatest contents of proanthocyanidins discovered in stems and rhizomes which allow to recommend the indicated organs of Comarum palustre as medical vegetable substance.

Поступила 24.10.2007 г
